

## PAPP-A [<sup>125</sup>I] IRMA készlet (REF: RK-4CT)

A PAPP-A [125I] IRMA készlet humán szérum pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) tartalmának *in vitro* direkt meghatározására szolgál, a 0 – 45 µg/ml mérési tartományban. A készlet 100 meghatározásra elegendő reagenst tartalmaz, amellyel két párhuzamos mérés esetén 42 minta PAPP-A koncentrációja határozható meg.

### Bevezetés

A PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein-A) a placenta által termelt nagy molekulás glikoprotein. Biológiai funkciója nem teljesen ismert, kimutatták proteolitikus és immun-szabályzó hatását.

A PAPP-A szérum koncentrációja az anyai vérben emelkedik a terhesség előrehaladásával. Más paraméterek figyelembevételével együtt (szabad βhCG koncentráció, magzati ultrahang, anyai életkor) a PAPP-A meghatározás használható a Down kór és más genetikai rendellenességek kockázat-megállapítására a terhesség első trimeszterében. A 0,5 MOM (multiple of median) alatti PAPP-A értékek kórosnak tekinthetők, azonban a mérési eredmény egymagában nem diagnosztikai értékű. A számítógépes kiértékeléshez egy megfelelő, e célra validált szoftver szükséges. Minden laboratóriumnak meg kell állapítani a saját MOM értékeit.

### A mérés elve

A mérőkészlet a szilárd fázisú immunoradiometrikus assay (IRMA) működési elvét alkalmazza. Ehhez két olyan monoklonális antitest szükséges, amelyek a molekula két különböző epitopját ismerik fel. A két antitest egyike radiojóddal jelzett (jelző antitest), a másikuk jelöletlen (ún. "capture" antitest).

A bevont csöves rendszerek jelen változatában az antigénnek a két antitesttel kialakult immunkomplexe ("szendvics") reaktív kémcső felületén mint szilárd fázison kötődik meg. A két órás reakcióidőt követően a reakcióelegyet a kémcsőből kiöntjük, és pufferes mosás után gamma-számlálóval mérjük a radioaktivitást. A kémcsővekben mért radioaktivitás egyenesen arányos a rendszerben lévő antigén koncentrációjával. Az ismert koncentrációjú standardok kötési értékei alapján szerkesztett kalibrációs görbéről az ismeretlen minták koncentrációit kötési értékeik alapján visszaolvassuk.

### A készlet tartalma

- 1 flakon <sup>125</sup>I-TRACER (21 ml), pufferes oldat radioaktivitása <740kBq, 0,1 % nátrium-azidot tartalmaz.
- 6 üveg STANDARD (6 x 0,4 ml), 0,1 % Kathon CG tartósítóval. Koncentrációjuk (S1 - S6): 0, 0,45, 1,35, 4,5, 13,5, 45 µg/ml. (1 IU/1 = 4,5 µg/ml).

3. 2 üveg ELLENŐRZŐ SZÉRUM (2x0,4 ml) 0,1 % Kathon CG tartósítóval. Koncentrációját a kísérő minőségellenőrzési bizonylat tartalmazza.

4. 2 doboz BEVONT CSŐ (2x50 db), 12x75 mm-es szabvány RIA kémcső, zárt műanyag dobozban.

5. 1 üveg MOSÓPUFFER KONCENTRÁTUM (20 ml) 0,1 % nátrium-azid tartósítóval, 700 ml desztillált vízzel hígítandó.

1 db Minőségellenőrzési bizonylat  
1 db Használati utasítás

### A készlet felhasználásához szükséges anyagok és eszközök

Kémcsőtartó, rugalmas kémcsőörögítő kiképzésben; pipetták (0,01, 0,2 és 2 ml térfogatra, eldobható műanyag hegyekkel); rázógép; kémcsőzáró műanyag fólia; papírvatta vagy itatóspapír; gamma-számláló.

#### Ajánlott:

Sorozat-adagoló (ismétlő) pipetta; folyadéküveges leosztó (diszpenzer), 1 literes folyadékedénnyel, 2 ml adagolási térfogatra.

### A mérendő minták gyűjtése és tárolása

Amennyiben a PAPP-A meghatározás a mintavételt követő 1-2 napon belül megtörténik, a mintákat 2-8°C -on, későbbi felhasználás esetén -20°C-on mélyhűtve tartjuk. A fagyasztott mintákat hagyjuk felolvadni, és felhasználás előtt alaposan homogenizáljuk. Kerüljük az ismételt visszafagyasztást.

Lipémiás, hemolizált, vagy más szempontból rendellenes szérumot ne használjunk mérésre.

### A reagensek előkészítése, tárolása

A mosóoldat koncentrátumot öntsük hozzá 700 ml desztillált vízhez. A hígított mosóoldatot 2-8°C -on tároljuk a készlet lejárataig.

A készlet többi komponense az első felnyitást követően 2-8°C -on tárolható a készlet lejárati idején belül. A pontos lejárati idő a kísérő bizonylaton és a dobozcímkén van feltüntetve.

### A meghatározás menete

(ld. Folyamatábra, 1. Táblázat)

1. Jelöljük meg két-két csövet: összes beütésszám (T), standard (S1-S6), ellenőrző szérum (C1-C2); vizsgálandó minták (M).
2. Mérjük 10 µL STANDARDot, ill. ELLENŐRZŐ SZÉRUMot, és szérummintát a megfelelő csövekbe.
3. Mérjük minden csőbe 200 µL TRACER oldatot.
4. Helyezzük a csöveket rögzítő kémcsőtartó állványba. Állítsuk be a sebességet úgy, hogy a folyadék valamennyi kémcsőben mozgásban legyen. Kevertessük 2 órán át szobahőmérsékleten.

5. Adjunk minden csőhöz 2 ml mosópuffert, majd a csőtartót fejfelé fordítva, egyetlen határozott, gyors mozdulattal öntsük le a felülúszót, majd a tartót változatlan helyzetben (visszafordítás nélkül!) tegyük papírvattára 2 percre.
6. Ismételjük meg a mosási lépést kétszer, az 5. pontnak megfelelően.
7. Mérjük meg a csövek radioaktivitását gamma-számlálóval és számítsuk ki az eredményeket az alábbiak szerint.

1. Táblázat: Folyamatábra, pipettázási kalauz (térfogatok mikroliterben)

	T	S1-S6	Ell. szérum	Minta
Standard		10		
Ell. szérum			10	
Minta				10
Tracer	200	200	200	200
Kevertetés, 2 óra szobahőmérsékleten				
Mosópuffer		2000	2000	2000
Folyadék leöntése, szárítás itatóspapíron				
Mosópuffer		2000	2000	2000
Folyadék leöntése, szárítás itatóspapíron				
Mosópuffer		2000	2000	2000
Folyadék leöntése, szárítás itatóspapíron				
Radioaktivitás mérés (min. 60 sec/cső)				
Adatfeldolgozás				

### Az eredmények számítása

A számítás menetét jellemző mérési adatokkal szemléltetjük. A kapott számadatoknak és a kalibrációs görbének hasonlítaniuk kell a 2. táblázathoz, illetve az 1. ábrához.

Számítsuk ki a párhuzamos csövek beütésszámainak (cpm) középértékét.

Log-log papíron ábrázoljuk a standard koncentrációkhoz tartozó átlag cpm értékeket. Olvassuk le a mérendő minták koncentrációit a standard görbéről az átlag cpm értékek alapján.

Egyes adat-kiértékelésekhez, rendszerint minőségellenőrzési célból, szükség lehet a specifikus kötési értékekre. Erre a B/T értékek használhatók, amelyek számításához a standardok, illetve minták NSB-vel (azaz az S1 beütésszámával) korrigált értékeit osztjuk a totál aktivitással az alábbi egyenlet szerint:

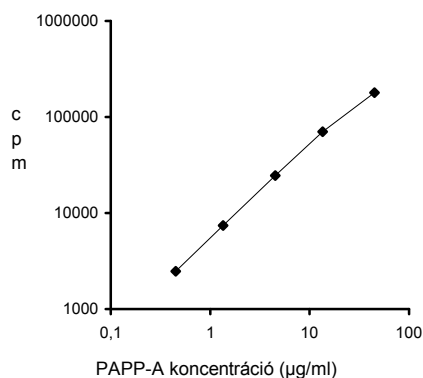
$$B/T (\%) = \frac{S2-6/C/Mx (\text{cpm}) - S1(\text{cpm})}{T (\text{cpm})} \times 100$$

Egy jellegzetes mérési adatsort foglalj össze a 2. táblázat, míg az 1. ábra egy jellemző standard görbét mutat.

A korszerű mérőkészülékek lehetővé teszik a radioaktivitás-mérést követő azonnali ("on-line") számítógépes adatfeldolgozást is. A sokféle feldolgozó program közül jelen készítményhez speciálisan immunometrikus assay-re kifejlesztett spline illesztő program használatát javasoljuk. Ügyeljünk arra, hogy vannak olyan kiértékelő programok, amelyek a 0-standard és az első standard között is interpolálnak, de a számított koncentrációk közül csak azok tekinthetők valósnak, amelyek értéke magasabb, mint a mérés statisztikailag meghatározott kimutatási határa (ld. érzékenység).

2. Táblázat Jellemző mérési eredmények

Csövek	Beütés-szám cpm	Átlag cpm	B/T%
T	324642 330422	327532	-
S1	73 101	87	0,03
S2	2564 2627	2564	0,76
S3	7583 7386	7485	2,26
S4	25131 24176	24654	7,50
S5	71400 69580	70490	21,55
S6	178872 180902	179887	54,90
C1	35452 37484	36468	11,11
C2	68212 64829	66520	20,28



1. ábra  
Tipikus standard görbe  
(Minta-meghatározásra nem használható!)

## Minőségi jellemzők

### Az assay jellemző paraméterei

Bmax/T > 40%  
NSB/T < 0,1%

### Érzékenység

Jelen készlettel az analitikai érzékenység a 0-standarddal 15 párhuzamos mérésből meghatározva 0,0143 µg/ml. Értéke egyenlő a 0-standard B0+2\*SD kötési értékéhez tartozó koncentrációival.

### Ismert mennyiség visszanyerése ("recovery")

Egyéni szérummintákhoz ismert mennyiségű PAPP-A-t adva, a visszanyerés (recovery) 99,4 ± 3,3 % (közéérték ± SD, n=20).

### Hígítási teszt (linearity)

Egyedi szérumminták S1 standarddal végzett sorozat-hígításakor a várt (x) és a mért (y) koncentrációértékek között az alábbi lineáris összefüggés adódott:

$$Y = 1,047 x - 0,08 \quad R = 0,9995 \quad n = 25$$

### Nagy-dózisú Hook effektus

Az effektus 800 µg/ml alatt nem jelentkezik. Bármely mintának, amelynek koncentrációja a 45-800 µg/ml tartományba esik ezzel a készlettel mérve, a koncentrációját több mint 45 µg/ml-nek fogjuk találni.

## Pontosság

Az intra-assay pontosságot 15 párhuzamossal egy sorozaton belül, az inter-assay pontosságot 2 párhuzamossal, 22 független mérésben értékelve, 7 mintára az alábbi adatokat kaptuk.

Intra-assay		Inter-assay	
átlag (µg/ml)	CV %	átlag (µg/ml)	CV %
6,57	6,20	6,75	2,80
12,31	1,68	12,74	2,73
1,91	4,07	1,82	3,07
4,11	4,69	4,04	2,98
7,04	4,12	6,96	3,84
15,06	4,51	15,53	3,82
27,47	3,49	27,43	2,88

### Várható referens tartomány

Terhességi hét	1MOM (µg/ml)	N
11	9,5	100
12	13,5	100
13	23,1	58

A megadott referens tartomány csak tájékoztató adatnak tekintendő, és nem helyettesítheti a készletet felhasználó laboratóriumok saját területükre jellemző normálértékének megállapítását.

## Megjegyzések, tanácsok

1) **Figyelem, hibaforrás!** A bevont kémcsövek nem tartalmaznak külön feliratot. Közöséges kémcsövekkel való összetévesztésük komoly mérési hibákhoz vezethet! Ennek elkerülésére a műanyag dobozból soha ne vegyünk ki többet a szükséges mennyiségnél, illetve a felhasználatlan kémcsöveket azonnal tegyük vissza eredeti tartódobozukba. Ha az összekeverés veszélye a feldolgozás alatt is fennáll, célszerű a bevont csöveket más módon is megjelölni (pl. üvegre író tollal "meggyűrűzni").

2) **Figyelem, hibaforrás!** Kevertetésre csak olyan kémcsótartó használható, amelyben a csövek rögzítve vannak. "Lötyögős" állványban a kémcsövek tartalma egyáltalán nem, vagy egyenetlenül keveredik, annak ellenére, hogy maga az állvány, és a kémcső mozgásban van. Egyenetlen, illetve tökéletlen keverés teljesen hamis (fals alacsony!) mérési eredményekhez vezethet!

3) **A mosópuffer adagolása.** A mosópuffer legcélszerűbben hajlékony kivezető csővel felszerelt diszpenzerekből adagolható, amelyhez legalább 800 ml-es folyadék-edény csatlakozik. A hajlékony csővéggel az asztalon fekvő kémcsőállvány fölött végighaladva a mosópuffer hozzáadása gyors és hibamentes. Diszpenzer hiányában kellően nagy térfogatú fecskendővel ellátott ismétlő pipetta használható.

## Az assay korlátai

**A megfelelő, validált szoftver nélkül, ezen készlet nem alkalmas a triszómia 21 kockázatának meghatározására!**

## Egyéb tudnivalók

Felhívjuk a figyelmet arra, hogy a különböző gyártási számú készletek egyes komponensei nem helyettesíthetők sem egymással, sem más gyártó PAPP-A készletének komponenseivel.

## Biztonsági óvrendszabályok

### Radioaktivitás

A készlet radioaktív anyagot tartalmaz. A felhasználó laboratóriumok felelőssége, hogy munkájuk során ill. a védőcsomagolás esetleges sérülése esetén a radioaktív anyagok tárolására, felhasználására, és kezelésére vonatkozó törvényi szabályozás és hatósági előírások szerint járjanak el.










### Fertőzésveszély

A készletben lévő humán szérumot tartalmazó komponensek előállításához felhasznált szérum HIV-Ab és HBsAg vizsgálatra negatív eredményt adott. Ennek ellenére a humán szérumot tartalmazó komponenseket potenciálisan fertőzőként kell kezelni, és az erre vonatkozó általános laboratóriumi higiénés szabályokat be kell tartani.

### Mérgező anyagok

A készlet egyes komponensei tartósítószerként nátrium-azidot tartalmaznak. A készlet összes nátrium-azid tartalma 41 mg. A nátrium-azid nemcsak mérgező anyag, de belőle rézzel, vagy ólommal érintkezve robbanásveszélyes azidok is keletkezhetnek. A mérgezés a laboratóriumi munkák általános biztonsági előírásainak betartásával kerülhető el. A nehézfém-azidok keletkezésének megakadályozására a nem-radioaktív hulladék reagenseket nagy mennyiségű vízzel öblítve juttassuk a csatornahálózatba.

A standardok és az ellenőrző szérum tartósítására Kathon CG-t alkalmazunk. A készlet összes Kathon CG tartalma 3,2 mg. A Kathon CG erős enzim anyag. A mérgezés a laboratóriumi munkák biztonsági előírásainak betartásával elkerülhető.

	Lejáratási idő	<b>CONTROL</b>	Kontrol
	Gyártási szám	<b>CAL</b>	Standard
	Vigyázat, lásd kapcsolódó dokumentumok	<b>CT</b>	Bevont cső
	Biológiai veszély	<b>TRAC</b>	Tracer
	Lásd használati utasítás	<b>WASHB</b>	Mosópuffer
	In vitro diagnosztikai eszköz	<b>REF</b>	Katalógus szám
	Gyártó		2-8°C-on tárolandó
	Radioaktív anyag		

WEB oldal: <http://www.izotop.hu>

Technikai e-mail: [mailto:immuno@izotop.hu](mailto:mailto:immuno@izotop.hu)

Kereskedelmi e-mail: [commerce@izotop.hu](mailto:commerce@izotop.hu)

**IZOTOP**  
IZOTÓP INTÉZET Kft.  
1535 Budapest, Pf.: 851.  
Tel.: 392-2577, Fax: 395-9247  
\*03506\*